

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CAMPUS DE CURITIBANOS

CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS

André Luiz Graf Junior

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO
DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary

Curitibanos

2018

André Luiz Graf Junior

**USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO
DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em
Agronomia, do Centro de Ciências Rurais, do
Campus de Curitibanos, da Universidade Federal
de Santa Catarina, como requisito para a obtenção
do Título de Bacharel em Agronomia.
Orientadora: Prof. Dra. Adriana Terumi Itako

Curitibanos

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Graf Junior, André Luiz

Uso de Óleos Essenciais no Controle do Fungo Sclerotinia sclerotiorum / André Luiz Graf Junior; orientadora, Adriana Terumi Itako - Curitibanos, SC, 2018.
42p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos. Graduação em Agronomia.

Inclui referências

1. Agronomia. 2. Fitopatologia. 3. Controle Alternativo. 4. Fungo Sclerotinia sclerotiorum. 5. Plantas medicinais. I. Itako, Adriana Terumi. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Agronomia.

André Luiz Graf Junior

USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONTROLE ALTERNATIVO DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao Colegiado do Curso de
Agronomia, do Campus de Curitibanos da
Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Orientadora: Adriana Terumi Itako

Data da defesa: 19/06/2018

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:



Presidente e Orientadora: Adriana Terumi Itako

Titulação: Doutora

Área de concentração em Fitopatologia

Universidade Federal de Santa Catarina



Membro Titular: Elis Borcioni

Titulação Doutora

Área de concentração em Produção Vegetal

Universidade Federal de Santa Catarina



Membro Titular: Alexandre França Pires

Titulação Graduação em Agronomia

Universidade Federal de Santa Catarina

Local: Universidade Federal de Santa Catarina

Campus de Curitibanos

Coordenação do Curso de Graduação em Agronomia

Dedico esse trabalho em especial para minha família a qual sempre mostrou-se presente me incentivando e apoiando em todas as fases da minha vida.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional nas horas que mais precisei.

Aos professores pelo fato de estarem dispostos a ensinar sem medir esforços.

A minha orientadora pela dedicação demonstrada a ensinar e incentivar no decorrer de todos trabalhos executados.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, que me deu a oportunidade de alcançar meus objetivos e de viver e conquistar tudo que tenho sem que eu perdesse a esperança.

Aos meus pais Judite Koaski Graf e André Luiz Graf, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu irmão Everton Luis Graf (*in memoriam*) que sempre acreditou e incentivou que eu fosse atrás dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Andrea Cristiane B. Graf e Paulo Cesar Graf, pelo amor e carinho passados a mim.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Adriana Terumi Itako por ter me orientado e sempre me mostrando as melhores formas de construir trabalhos e correr atrás dos sonhos, de forma única, admirável exemplar.

Ao Prof. Dr. João Batista Tolentino Jr, que se disponibilizou desde o delineamento às análises finais deste trabalho.

Aos meus amigos que acompanharam e auxiliaram na elaboração e execução desse trabalho. Em especial Elisa Coser e os demais colegas de laboratório.

A minha namorada Carla Santos pela compreensão, apoio e amor nos momentos que precisei.

E a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para que houvesse a realização desse trabalho.

RESUMO

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo pertencente ao filo Ascomycota, causador do mofo branco, tendo capacidade de infectar mais de 400 espécies de plantas. Esse fungo tem a capacidade de formar estruturas de resistência que são denominadas de escleródios, os quais permanecem no solo cerca de oito anos, sem perder a sua viabilidade. Esses escleródios podem germinar na forma micelial ou produzir apotécios. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e fungicida *fluazinam* no controle do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Além de avaliar o potencial dos óleos essenciais acima citados, foram adicionados o de hortelã (*Mentha arvensis*) e gengibre (*Zingiber officinallis*) na inibição da germinação dos escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Para a avaliação micelial foram utilizadas doses crescentes de 0, 250, 500 e 1000 ppm do óleo essencial de alecrim, capim-limão, cravo da índia e eucalipto. Aliquotas dos óleos foram adicionadas em meio de cultura BDA fundente juntamente com antibiótico *Streptomycina* e *Penicillina* 500 mg.L⁻¹ e Tween 20® a 0,5%. Após a solidificação dos meios, um disco de micélio do fungo foi repicado para o centro de cada placa de Petri, sendo vedadas e incubadas em câmara de crescimento (25°C e fotoperíodo de 12h). A avaliação iniciou-se 24h após a instalação do experimento. O delineamento foi inteiramente ao acaso com 5 repetições. Para a avaliação da germinação dos escleródios, os mesmos foram depositados em placas de Petri de forma equidistante (6 escleródios) sobre a superfície do meio ágar água (AA) com a solução dos óleos na dosagem de 5000 ppm. O óleo essencial de alecrim foi eficiente no índice de velocidade de crescimento micelial, já os óleos essenciais de capim-limão, cravo e eucalipto nas dosagens de 500 e 1000 ppm tiveram 100% de inibição e na dosagem de 250 ppm tiveram 48%, 45% e 44% na inibição do crescimento micelial, respectivamente. No teste de germinação dos escleródios os óleos essenciais de alecrim e eucalipto inibiram a germinação até o 5° e 7° dia, respectivamente. O óleo essencial de hortelã inibiu até o 15° dia a germinação dos escleródios. O óleo essencial de capim limão inibiu até o 24° dia e a partir deste período permaneceu com potencial de inibição de germinação em 94%. Já o óleo essencial de cravo inibiu a germinação dos escleródios até o 45° dia. O cravo da índia e o capim limão inativaram em 100% e 50% a viabilidade dos escleródios, respectivamente, pelo teste de tetrazolio (TCT).

Palavras-chave: Mofo Branco. Escleródios. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Sclerotinia sclerotiorum is a fungus belonging to the Ascomycota phylum, which causes white mold, and has the capacity to infect more than 400 species of plants. This fungus has the ability to form resistance structures that are called sclerotia, which remain in the soil for about eight years, without losing its viability. These sclerodes can germinate in the mycelial form or produce apothecium. The aim of this research was to evaluate the potential of *Rosmarinus officinalis*, *Cymbopogon citratus*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus citriodora* essential oils in the control of the mycelial growth of the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. In addition to assessing the potential of essential oils of *R. officinalis*, *C. citratus*, *S. aromaticum*, *E. citriodora*, *Mentha arvensis* and *Zingiber officinalis* in the *S. sclerotiorum* fungus sclerotia germination. For the mycelial evaluation, increasing doses of 0, 250, 500 and 1000 ppm of *R. officinalis*, *C. citratus*, *S. aromaticum* and *E. citriodora* oil were used. Aliquots of the oils were added in BDA fluxing medium with the antibiotic *Streptomycine* and *Penicillin* 500 mg.L⁻¹ and 0.5% Tween 20[®]. After media solidification, a mycelial disc of the fungus was peeled to the center of each plate, sealed and incubated in a growth chamber (25° C and 12h photoperiod). The evaluation started 24 hours after the experiment was set up. The design was entirely randomized with 5 replicates. To evaluate the germination of the sclerotia, they were deposited in Petri dishes equidistantly (6 sclerotia) on the surface of the water agar medium (AA) with the solution of the oils at a dosage of 5000 ppm. The essential oil of *R. officinalis* was efficient in the mycelial growth index speed, while the essential oils of *C. citratus*, *M. arvensis* and *E. citriodora* in the dosages of 500 and 1000 ppm had 100% of inhibition and in the dosage of 250 ppm had 48%, 45% and 44% inhibition of mycelial growth, respectively. In the sclerotia germination test the essential oils of *R. officinalis* and *E. citriodora* inhibited germination until the 5th and 7th day, respectively. The essential oil of *M. arvensis* inhibited the germination until the 15th day. The essential oil of *C. citratus* inhibited until the 24th day and from this period remained with potential of inhibition of germination in 94%. The essential oil *S. aromaticum* inhibited the germination of sclerotia until the 45th day. *S. aromaticum* and *C. citratus* inactivated 100% and 50% of viability of sclerotia, respectively, by the TCT test.

Keywords: White mold. Sclerodes. *Medicinal plants*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escleródios do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , coletados em campo com soja (<i>Glycine max</i>) safra 2017/2018 na cidade de Brunópolis-SC.....	17
Figura 2: Escleródios do fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , formados após 30 dias de incubação em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, cultivados em meio BDA.....	17
Figura 3: Observação de escleródios germinados e não germinados.....	28
Figura 4: (IVCM) Índice de velocidade de crescimento micelial (cm/h) de <i>S. sclerotiorum</i> tratados com óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	31
Figura 5: Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) (porcentagem%) de <i>S. sclerotiorum</i> tratados com óleo essencial de Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) (A), Capim-Limão (<i>Cymbopogon citratus</i>) (B), Cravo da índia (<i>Syzygium aromaticum</i>) (C) e eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>) (D).....	31
Figura 6: Crescimento micelial do Fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , tratados com óleo essencial de alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) e cravo da índia (<i>Syzygium aromaticum</i>), nas dosagens de 0, 250, 500 e 1000 ppm, além da testemunha tratada com fungicida Fluazinam.....	32
Figura 7: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a porcentagem de inibição da germinação de escleródios do fungo <i>S. sclerotiorum</i> tratados com óleos essenciais de <i>R. officinalis</i> , <i>C. citratus</i> , <i>S. aromaticum</i> , <i>E. citriodora</i> , <i>M. arvensis</i> e <i>Z. officinalis</i> na dose 5000 ppm, fungicida fluazinam (Cygnus®) e testemunha.....	34
Figura 8: Observação da viabilidade de escleródios após teste TCT.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Viabilidade de escleródios do fungo <i>S. sclerotiorum</i> pelo teste tetrazólio (%) sob tratamento com óleos essenciais de cravo da índia e capim limão, fungicida fluazinam a 1% e testemunha.....	32
Tabela 2: Viabilidade de escleródios do fungo <i>S. sclerotiorum</i> pelo teste tetrazólio (%) sob tratamento com óleos essenciais de cravo da índia e capim limão, fungicida fluazinam a 1% e testemunha.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Meio ágar água

AACCM: Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial

IVCM: Índice de Velocidade de Crescimento Micelial

BDA: Batata Dextrose Ágar

BOD: Câmara de Crescimento

DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado

R: software estatístico

TCT: Teste de Trifenil Cloreto de Tetrazólio

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MIC: Concentração Inibitória Mínima

CIM: concentração inibitória mínima

CFM: concentração fungicida mínima

PIC: inibição do crescimento micelial

PIG: percentagem de inibição de esporos

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	MOFO BRANCO	17
2.2	CONTROLE DO FUNGO <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	18
2.3	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS	20
2.3.1	Óleo essencial de alecrim	22
2.3.2	Óleo essencial de capim-limão.....	22
2.3.3	Óleo essencial de cravo.....	23
2.3.4	Óleo essencial de eucalipto.....	23
2.3.5	Óleo essencial de Gengibre	24
2.3.6	Óleo essencial de Hortelã	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	ISOLAMENTO FÚNGICO	26
3.2	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	26
3.3	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	26
3.4	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS	27
3.5	TESTE DE TRIFENIL CLORETO DE TETRAZÓLIO (TCT)	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	30
4.2	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS	33
5	CONCLUSÃO	38

REFERÊNCIAS 39

1 INTRODUÇÃO

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pertencente ao filo Ascomycota, causador da doença popularmente conhecida como mofo branco (KIMATI et al., 2005), o qual pode infectar mais de 400 espécies de plantas, entre elas, monocotiledôneas e dicotiledôneas, além de estar distribuído mundialmente (BOLAND; HALL, 1994). Esse fungo tem a capacidade de formar estruturas de resistência denominadas de escleródios (AGRIOS, 2005), os quais permanecem no solo cerca de oito anos, sem perder a sua viabilidade (KIMATI et al., 2005).

Pelo fato desse patógeno estar ligado ao solo, o controle torna-se uma tarefa difícil, pois, as medidas a serem tomadas são complexas e têm eficiência prejudicada, devido a cobertura dos produtos sobre o fungo (AMORIM et al., 2011). O controle da doença pode ser feito com a aplicação de fungicidas pertencentes a diferentes grupos de químicos (VIEIRA et al., 2001), reduzindo significativamente a viabilidade dos escleródios (MUELLER et al., 2002).

Atualmente, os tratamentos com fungicidas, principalmente quando aplicados de forma errônea e em excesso, podem acarretar efeitos negativos no âmbito ambiental, econômico e social. Portanto, a busca por novos produtos a base de plantas medicinais pode minimizar os problemas e surge como uma alternativa viável por possuírem ação antifúngica (MICHEREFF; BARROS, 2001).

A partir dessas plantas é possível obter compostos secundários como: extratos e óleos essenciais, os quais podem ser uma opção no controle de fitopatógenos, pois possuem potencial ecológico, a fim de reduzir o emprego de produtos sintéticos (VENTUROSOSO et al., 2011).

Trabalhos indicam o potencial fungitóxico das plantas diretamente sobre o patógeno, como também na indução de mecanismos de defesa da planta, além de causar diversas alterações morfológicas nas hifas e degeneração celular (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005; COSTA et al., 2010).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do uso de óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo da índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe) e hortelã (*Mentha arvensis*) como controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito inibidor do crescimento e da velocidade de crescimento micelial do fungo *S. Sclerotiorum in vitro*, através de doses crescente dos óleos essenciais;
- Avaliar o efeito dos óleos essenciais na germinação *in vitro* dos escleródios do fungo *S. Sclerotiorum*;
- Realizar o teste de viabilidade (Teste TCT) dos escleródios após o tratamento com os óleos essenciais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MOFO BRANCO

Sclerotinia sclerotiorum é o agente fúngico causador da doença conhecida popularmente como mofo branco. Pertence ao filo Ascomycota (KIMATI et al., 2005) classe *Discomycetes*, ordem *Helotiales* e família *Sclerotiniaceae*. Esse patógeno pode infectar mais de 400 espécies de plantas entre elas, monocotiledôneas e dicotiledôneas e está distribuído mundialmente (BOLAND; HALL, 1994).

O fungo tem a capacidade de formar estruturas de resistência, que são denominadas escleródios, os quais são brancos no início de sua formação, e logo tornam-se enegrecidos e sólidos em sua parte externa. Os escleródios podem variar de tamanho, ficando entre 2 a 10 mm de diâmetro, embora apresentem geralmente uma característica sendo mais achatado e alongado que uma característica esférica. Essas estruturas podem permanecer no solo cerca de oito anos, sem perder a sua viabilidade (AGRIOS, 2005).



Figura 1: Escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, coletados em campo com soja (*Glycine max*) safra 2017/2018 na cidade de Brunópolis-SC.

Fonte: Autor, 2018.

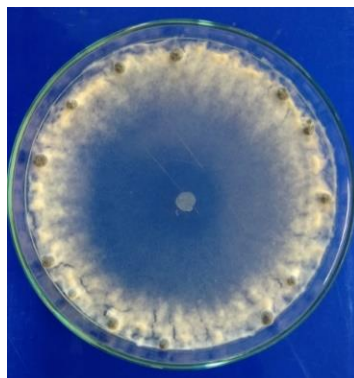


Figura 2: Escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, formados após 30 dias de incubação em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, cultivados em meio BDA.

Fonte: Autor, 2018.

Os escleródios podem germinar na superfície do solo ou em profundidade de até 5 cm, sendo essa germinação na forma micelial ou produzir apotécios de 4 até 10 mm de diâmetro, sendo esse lisos de coloração creme, que permanecem viáveis entre 7 a 10 dias, apresenta os ascos de forma cilíndrica medindo de 2 a 10 μm de diâmetro e entre 110 a 155 μm de comprimento, os quais contêm os ascósporos que tem forma elipsoidais (KIMATI et al., 2005; AMORIM et al., 2016).

As plantas quando têm seus caules infectados começam a apresentar um aspecto suculento e desenvolvem lesões pálidas ou marrom-escuras na base. Essas lesões, muitas vezes, são cobertas por manchas com um aspecto felpudo branco do micélio fúngico (AGRIOS, 2005), com o progresso da doença as lesões secam, adquirindo cor de palha (AMORIM et al., 2016).

Nos estágios iniciais as folhas infectadas parecem normais, porém a partir do momento que ocorre o crescimento do fungo, este desenvolve-se completamente através da haste, provocando o apodrecimento das extremidades. As folhas que apresentam lesão murcham e coalescem rapidamente. Em alguns casos, a infecção pode começar nas folhas e depois progredir para a haste (AGRIOS, 2005; EMBRAPA, 2017).

Os escleródios do fungo podem ser formados internamente na medula do tronco, como também podem ser formadas na parte externa da haste. Em folhas e pecíolos de plantas, tais como alface e beterraba, se ocorrer um ataque súbito, a planta pode morrer facilmente, pois o fungo infecta a base do caule e folhas inferiores.

O micélio fúngico e os escleródios aparecem normalmente na superfície inferior das folhas, mas sob condições de umidade, o fungo se desenvolve com mais facilidade e invade a planta completa, assim ele faz com que a planta apodreça, produzindo um mofo branco, ou seja, o micélio ao longo de toda a planta (AGRIOS, 2005).

As condições ambientais que predisõem a ocorrência da doença são temperatura e umidade, tendo seu desenvolvimento quando há formação de microclimas. Essa doença tem seu desenvolvimento em uma ampla faixa de temperatura, sendo de 5 até 30°C, mas é mais expressivo quando aos 25°C, entretanto, a umidade é um fator determinante para o desenvolvimento (KIMATI et al., 2005).

2.2 CONTROLE DO FUNGO *Sclerotinia sclerotiorum*

Por se tratar de um patógeno que está ligado ao solo, o controle torna-se uma tarefa difícil, pois as medidas são complexas e têm a eficiência prejudicada pelo fato dos produtos

não conseguirem atingir o fungo que se desenvolve internamente nos tecidos das plantas e por estarem enterrados no solo (AMORIM et al., 2011). O controle desse patógeno deve ser iniciado, evitando a entrada em áreas isentas, através de medidas como: uso de sementes certificadas, uso de equipamentos que foram utilizados em áreas infectadas e o tráfego de pessoas oriundas das mesmas. Outra alternativa, quando viável, é o uso do método da solarização. Essa metodologia consiste na eliminação do escleródio através do calor, tornando-os inviáveis. Este método é mais eficiente quando os escleródios estão na camada superficial do solo (KIMATI et al., 2005).

Outro fator importante é que os apotécios necessitam de luz para obter um bom desenvolvimento, deste modo, o uso da rotação de culturas, com gramíneas principalmente, as quais não são hospedeiras do fungo, podem servir como um método de controle. Isso ocorre pois, as palhadas cobrem o solo e impedem que haja a incidência de luz direta. Recomenda-se que seja utilizada, palhadas com degradação lenta, para que ainda estejam presente no solo na fase reprodutiva da cultura de interesse.

O plantio direto faz com que se desenvolvam outros microrganismos que parasitam os escleródios e fazem a degradação do mesmo, como por exemplo o *Trichoderma* spp.. Esse agente de controle biológico, é um produto comercial registrado no Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (STADINIK; TALAMINI, 2004; AMORIM et al., 2016).

O controle dessa doença pode ser feito com a aplicação de fungicidas, reduzindo significativamente a viabilidade dos escleródios (MUELLER et al., 2002). Há estudos com a utilização de fungicidas pertencentes aos grupos químicos dos benzimidazóis, fenilpiridinilaminas, carboxamidas, anilino pirimidina, anilidas e estrobilurinas, isoladamente, formulados em misturas ou em aplicações sequenciais alternadas. Sendo que desses, os maiores índices de controle foram observados com as fenilpiridinilaminas (fluazinam), carboxamidas (fluopyram e procimidona) e com uma mistura de anilida + estrobilurina (boscalid + dimoxystrobin), variando de 67% a 85% de controle. Ou ainda, as associações de fluazinam com tiofanato metílico (76%) ou com carbendazim (74%), procimidona com carbendazim (75%) (MEYER, 2013).

Zancan (2011), avaliou a eficiência dos fungicidas procimidone (grupo dicarboximidas) e o fungicida fluazinam (grupo fenilpiridinilamina) na inibição de *S. sclerotiorum* em sementes de feijão, independente das concentrações testadas. Porém, nas avaliações de inibição do fungo na fase vegetativa e reprodutiva da cultura do feijoeiro, foram observados resultados inconsistentes de controle, pois a aplicação não atingiu toda a área

(MUELLER et al., 2002). Sumida et al. (2015), estudaram diferentes agentes químicos para o controle do mofo branco, tendo como resultados que o fluazinam, cloreto de benzalcônio + fluazinam, iprodione e carbendazim exibiram maiores porcentagens de inibição de escleródios em 63,9%, 61,8%, 46,5% e 44,4%, respectivamente. Estes mesmos autores avaliaram também, o índice de germinação carponogênica, através da contagem do número total de apotécios. Os melhores resultados foram obtidos para fluazinam (100% de inibição), benzalcônio cloreto + fluazinam (82,8%) e iprodiona (63,1%).

2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS EM PLANTAS

Nos últimos anos, a população está em busca de produtos alimentícios sem resíduos de produtos químicos e menos poluentes ao meio ambiente. As consequências negativas do uso excessivo desses produtos são conhecidas, tanto pelo impacto ambiental como pelas intoxicações. Na busca de produtos alternativos aos químicos, o uso de produtos a base de plantas medicinais vem sendo gradativamente estudadas (MICHHEREFF; BARROS, 2001).

A utilização de compostos secundários de plantas medicinais, através dos extratos e óleos essenciais, é uma alternativa no controle de fitopatógenos, pois possuem potencial ecológico afim de reduzir o emprego de produtos sintéticos (VENTUROSOSO et al., 2011).

Vários estudos relatam o potencial das plantas medicinais no controle de fungos fitopatogênicos e na indução de mecanismos de defesa das plantas. Trabalhos indicam o potencial fungitóxico das plantas diretamente sobre o patógeno, como também na indução de mecanismos de defesa da planta, como a formação de papilas ou a síntese de proteínas relacionadas à patogênese. Estudos testando dosagens e intervalos de aplicações, vem sendo relatados quanto a eficiência e fitotoxidez (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005).

Dentre os trabalhos realizados, Fonseca et al. (2014), avaliaram o potencial do óleo de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e verificaram que o ele reduziu acentuadamente o crescimento dos fungos *S. sclerotiorum* e *Sclerotium rolfsii*. Para alguns fungos, a redução do crescimento foi de 100% quando utilizou se a concentração de 3000 mg.L⁻¹. Também foram encontrados resultados em que o óleo de alecrim-do-campo foi muito eficiente em concentrações menores, (250 mg.L⁻¹), onde observou-se uma redução de crescimento dos fungos variando de 29% a 80%; em concentração de 500 mg.L⁻¹, a redução observada variou de 29% a 98%; e na concentração de 1000 mg.L⁻¹, a redução de crescimento variou de 41% a 100%. Chiamaka et al. (2016), avaliaram o potencial dos óleos de *R. officinalis* e *Eucalyptus* no desenvolvimento do fungo *Colletotrichum* sp. e verificaram a

inibição do desenvolvimento micelial em 95% e 100% dos óleos de alecrim e eucalipto, respectivamente.

Já para a atividade fungitóxica do óleo essencial de capim-limão, Guimarães et al. (2011), realizaram testes sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum cubense*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Bipolaris* sp. e *Alternaria alternata*. A inibição micelial das quatro espécies fúngicas tiveram diferenças significativas para as diversas concentrações do óleo essencial testado sobre a inibição do crescimento micelial. As inibições dos crescimentos dos fungos diante das concentrações dos compostos estudados apresentaram comportamento linear, sendo que todos os fungos exibiram crescimento micelial inibido pelo óleo essencial de capim-limão.

Itako et al. (2013), verificaram que o óleo essencial de *C. citratus*, em doses crescentes, inibiu o desenvolvimento do fungo *A. solani* e induziu a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em plantas de tomate.

No ensaio realizado por Costa et al. (2010), analisando micélios dos fungos tratados com óleo essencial de cravo, observaram diversas alterações morfológicas, como: a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares; diminuição na nitidez da parede celular; intensa fragmentação das hifas, além de menor turgência das mesmas o qual é considerado indício de degeneração celular. Além disso, foram avaliados o crescimento micelial de fungos como: *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina* e os tratamentos com óleo de cravo apresentaram 100% de inibição do crescimento micelial, exceto para *M. phaseolina*. Resultados semelhantes encontrados por Lorenzetti et al. (2011), relataram que a concentração de 125 ppm de óleo essencial de cravo, óleo rico em eugenol, apresentaram 31% de inibição do crescimento micelial do fungo *Botrytis cinerea*.

Andrade e Vieira (2016), observaram o controle da antracnose, causada pelo *C. gloeosporioides* em frutos de mamoeiro, com o uso de óleos essenciais, assim observaram que com a concentração de 10 µL de capim-limão e anis inibiram 38,6% e 39,4%, sobre a germinação do fungo. Já na concentração de 30 µL os óleos essenciais de capim-limão com 28,4% e alecrim com 31,2% que apresentaram os maiores efeitos sobre a germinação. O óleo essencial de árvore-chá com 14,0%, sobre a germinação na concentração de 50 µL. O óleo essencial de menta com 9,4% sendo esse o maior efeito sobre os conídios na concentração de 100 µL dentre todos os outros tratamentos.

2.3.1 Óleo essencial de alecrim

O alecrim/alecrim-da-horta (*Rosmarinus officinalis* L.) é um arbusto sempre verde de 1 a 2 metros de altura, pertence à família da Lamiaceae, apresenta grande número de folhas, opostas, estreitas, lineares, verdes; as flores são brancas a lilás. A planta possui cheiro aromático e sabor levemente amargo. A reprodução ocorre por semente ou estacas. A parte de uso da planta são as folhas frescas ou secas e sumidades florais. A composição química dos óleos essenciais é de cinerol, borneol, linalol e canfora (SILVA et al., 1995; GRANDI, 2014), o que caracteriza o odor típico da planta, já em relação aos compostos não voláteis encontrado na espécie está relacionado à alguns ácidos como: labiático, cítrico, entre outros, além de alguns flavonoides, diterpenos e triterpenóides (GRANDI, 2014).

Estudos realizados por Santos et al. (2015), mostraram que os compostos voláteis 1,8-cineol, cânfora, eugenol e apineno, e composto fenólico de ácido carnosico tem sido associado com a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim. Afirma-se ainda que o composto 1,8-cineol é o que apresenta mais atividade antibacteriana, isso pode ser devido à sinergia, efeito de alguns componentes menores presentes no óleo. Os componentes em menores quantidades são críticos para a atividade do óleo essencial e podem ter um potencial de influência. A espécie mostrou-se eficaz no controle de diferentes bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella poona* e *Escherichia coli* (HUSSAIN et al., 2010).

2.3.2 Óleo essencial de capim-limão

O capim-limão/capim-cidreira/capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf) é uma gramínea perene, formam touceiras que podem chegar a 1 metro de altura, pertence à família Poaceae, apresenta rizomas curtos, folhas verdes, alongadas, ásperas nas duas faces, nervura central grossa (SILVA et al., 1995; GRANDI, 2014). Inflorescência em panícula de 40 cm de comprimento com numerosos fascículos. As partes da planta que podem ser utilizadas são as folhas e rizoma. A composição química do óleo essencial é de Citral e isômeros, aldeídos como: citroneral, cetonas, além de terpenos, flavonóides e triterpenóides (GRANDI, 2014).

Estudo realizados por Pinto et al. (2014), mostraram que em diferentes lâminas de irrigação para o cultivo de *C. citratus* os compostos encontrados em maior abundância são os isômeros de citral, além de geranial, neral e mirceno.

Já um estudo realizado por Boukhatem et al. (2014), nas condições de Argel, norte da África, revelaram que na extração do óleo essencial de capim-limão, foram encontrados 23 compostos representando 90,6% do total de óleo. Sendo que os principais componentes eram geranial (42,2%), neral (31,5%) e mireno (7,5%), além de outros compostos encontrados em menores quantidades.

2.3.3 Óleo essencial de cravo

Cravo-da-índia/cravo (*Syzygium aromaticum*) é uma árvore que pode atingir até 15 metros de altura, pertence à família das Myrtaceae. As folhas são inteiras coreáceas, nervadas e glabras; as flores são hermafroditas, pequenas e aromáticas de coloração róseas ou avermelhadas; os frutos são do tipo drupa elíptica, purpúrea e uniovulada. As partes utilizadas da espécie são os botões florais secos (onde é encontrado o cálice como uma pequena massa globulosa, conhecida como a “cabeça do cravo”) (LORENZI, 2008; GRANDI, 2014).

A composição química dos óleos essenciais dessa planta é grande parte de eugenol, acetil-eugenol, cavicol, cafeína, flavonoides, ésteres e taninos (GRANDI, 2014).

Estudos realizados por Beraldo et al. (2013), mostraram que na extração do óleo essencial, pelo método de arraste a vapor, a composição química foi de 77,58% de eugenol, o que comprova que há grande quantidade desse composto, como já descrito por outros autores. Silvetri et al. (2010), verificaram que o eugenol é o composto em maior quantidade (90,3%), além de β -cariofileno (4,83%) e acetato de eugenol (1,87%).

2.3.4 Óleo essencial de eucalipto

Eucalipto/eucalipto-limão (*Eucalyptus globulus* L.) é considerada uma árvore de grande porte, podendo medir até 60 metros de altura, sendo pertencente à família das Myrtaceae. As folhas são coriáceas, opostas, recobertas de uma penugem esbranquiçada, sendo que apresentam tipos morfológicos diferentes conforme a idade da planta (LORENZI, 2008; GRANDI, 2014), as flores são brancas, que podem ser solitárias ou agrupadas nas axilas das folhas (GRANDI, 2014), os frutos são operculados, medindo até 1,5 cm de comprimento; as sementes são escuras, pequenas, angulosas e irregularmente compridas (LORENZI, 2008; GRANDI, 2014). A parte de uso das espécies são as folhas mais velhas.

A constituição química dos óleos essenciais é basicamente por eucaliptol, além de pineno, canfeno, fencheno, eudesmol e substâncias aldeídicas e resinas (GRANDI, 2014).

Trabalho realizado por Manika et al. (2011), utilizaram a coleta de material em diferentes estações do ano de *E. citriodora* para extração do óleo essencial, após análise química foram encontrados os constituintes: citronelal 87,4%, seguido de citronelol 9,9%, linalol 6,4%, isopulegol 3,1% e cironellyl acetato 9,9%.

A partir dos compostos do óleo essencial Piatti et al. (2011), avaliaram o efeito inibitório do crescimento micelial de *Penicillium* sp. sob diferentes concentrações do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* o qual encontraram que os tratamentos com concentrações de 0,25, 0,5 e 1% do óleo essencial apresentaram inibição do crescimento micelial do fungo a partir do 2º dia de avaliação, além de não encontrarem diferença significativa com a testemunha positiva (fungicida) utilizada no experimento.

2.3.5 Óleo essencial de Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinalis* Roscoe), é um rizoma bianual, tuberoso com ramificações eretas, anuais de até 1,5 metros de altura, pertence à família da Zingiberaceae. As folhas são alternas, invaginante, estreitas e agudas; as flores são dispostas em ramificações especiais, em ramos mais curtos que os foliares, munidas de brácteas obtusas. A planta apresenta um odor agradável, aromático, sabor quente e picante. A forma de multiplicação da espécie ocorre através da fragmentação dos rizomas. As partes que podem ser utilizadas são os rizomas, as raízes e as folhas (GRANDI, 2014).

Os óleos essenciais têm uma composição química a base de citral, cinerol, canfeno, sesquiterpenos, além de um óleo de resina, o qual lhe confere o sabor picante, rico em zingeróis (LORENZI, 2008; GRANDI, 2014). Alguns desses compostos já foram encontrados por Dabague et al. (2011), que na extração do óleo essencial, encontraram grandes quantidades de geranial, neral, geraniol, eucaliptol, canfeno e zingibereno. Saberi e Alimohammadi (2016), realizaram a extração de óleo essencial dos rizomas do gengibre, pelo aparelho de Clevenger e encontraram o α -zingibereno como composto predominante, o qual é pertencente aos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e constituiu aproximadamente 32% do óleo essencial total extraído. Os autores afirmam ainda, que o aroma específico do gengibre é predominantemente relacionado ao zingibereno.

2.3.6 Óleo essencial de Hortelã

Hortelã/Menta/Hortelã-pimenta (*Mentha arvensis*) é uma herbácea, com caule quadrangular e piloso, planta com porte de 40 a 60 cm de altura. Pertence à família da Lamiaceae. As folhas são opostas, simples, retorcidas e um pouco arredondadas na base, além de serem discolor e apresentarem aspecto ligeiramente aveludado nas nervuras inferiores; as flores são purpúreas, dispostas no ápice dos ramos e em espigas laxas, agudas e opostas, sendo que a espécie carrega nas flores as características da labiadas, com odor forte, aromático. A multiplicação ocorre por estolões enraizados, ponteiros ou desdobramento de touceiras. As partes utilizadas da planta são as folhas ou a sumidade florida (SILVA et al., 1995; GRANDI, 2014).

Os óleos essenciais são compostos por mentol, mentenona, cineol, ácidos p-cumarínicos, perílico, caféico e outros, além da constituição por carotenoides, colina e betaina (LORENZI, 2008; SILVA et al., 1995). Watanabe et al. (2006), durante as análises encontraram em maiores quantidades os constituintes mentol, isomentona e mentona. Compostos encontrados nos estudos de Scavroni et al. (2006), que testaram a aplicação de hormônios vegetais e comprovaram que os mesmos não têm alteração na composição do óleo essencial estudado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO FÚNGICO

O experimento foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos no Laboratório de Fitopatologia. Entre os anos de 2016 à 2018. A obtenção do fungo foi a partir de plantas de soja (*Glycine max*) que apresentavam sintomas característicos da doença. proveniente de Brunópolis – SC.

O isolamento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* foi realizado através da desinfecção superficial dos escleródios (1 min. em álcool a 70%, 1 min. em hipoclorito de sódio a 2% e em seguida, enxaguados em água destilada) e cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sob incubação de fotoperíodo de 12 horas a 25°C.

3.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), gengibre (*Zingiber officinalis*) e hortelã (*Mentha arvensis*) foram adquiridos comercialmente, pela empresa By Samia[®].

3.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

Para a avaliação *in vitro* foram utilizadas concentrações crescentes (0, 250, 500 e 1000 ppm) dos óleos essenciais de alecrim, capim limão, cravo da índia e eucalipto. Alíquotas dos óleos foram adicionadas em meio de cultura BDA fundente, além do antibiótico (estreptomicina e penicillina) 500 mg.L⁻¹ e Tween20® a 0,5%.

Após a solidificação do meio, um disco de micélio (5 mm de diâmetro) do fungo foi repicado no centro das placas de Petri. As placas foram vedadas com filme plástico, incubadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do crescimento micelial iniciou-se 24 horas após a instalação do experimento, realizando duas vezes ao dia, foi medido utilizando duas medidas opostas do diâmetro da colônia fúngica. A avaliação foi realizada durante sete dias ou até que o crescimento micelial no tratamento controle atingisse 80-90% da totalidade da placa de Petri.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com o óleo de quatro plantas medicinais em 4 doses e 5 repetições. Cada placa de Petri foi considerada uma repetição. Após obtenção dos dados do crescimento foram calculadas a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e o índice de velocidade de crescimento micelial do fungo (IVCM). Utilizou-se a equação proposta por CAMPBELL & MADDEN (1990):

$$AACCM = \sum \left(\frac{y_{i+1} + y_i}{2} \right) \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

Em que y_i e y_{i+1} são os valores de crescimento da colônia observados em duas avaliações consecutivas, t_{i+1} e t_i são os períodos das avaliações.

Para o cálculo do índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) foi aplicada a fórmula:

$$\text{Velocidade} = \frac{\text{diâmetro do halo de crescimento}}{\text{nº de dias de crescimento}}$$

Sendo o cálculo realizado no dia em que foi observada a paralisação do crescimento do patógeno. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade através do software estatístico R.

3.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS

Para a produção de escleródios foram utilizadas 40 placas de Petri contendo meio BDA. Um disco de micélio (5 mm de diâmetro) do fungo *S. sclerotiorum*, com 7 dias de crescimento, foi repicado no centro de cada placas de Petri. As placas foram vedadas com filme plástico, incubadas em câmara de crescimento a 25°C e fotoperíodo de 12 horas, durante 30 dias para a formação dos escleródios.

Para avaliar a inibição da germinação dos escleródios *in vitro*, foi utilizada a dose de 5000 ppm, dos óleos essenciais de alecrim, capim-limão, cravo da índia, eucalipto, gengibre e hortelã. Os óleos foram adicionados em placas de Petri (4 mL) sobre o meio ágar-água (AA) solidificado além de adicionar uma alíquota com a mesma proporção de Tween20® a 0,5%.

Os escleródios, obtidos do crescimento por 30 dias, foram previamente desinfetados em uma solução de álcool a 70% (1 min.), hipoclorito de sódio a 2% (1 min.) e enxaguados em água destilada. Após esse procedimento, os escleródios foram depositados de forma equidistante (6 escleródios) sobre a superfície do meio AA. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em câmara de crescimento a 25°C com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação da inibição da germinação dos escleródios iniciou-se 24 horas após a instalação do experimento e foram avaliadas diariamente durante quarenta e cinco (45) dias, observando os escleródios germinados e não germinados, com auxílio de um microscópio estereoscópio.

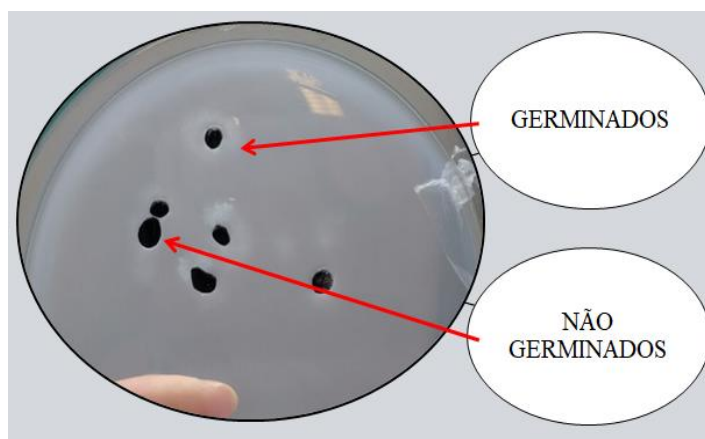


Figura 3: Observação de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* considerados germinados (presença do micélio ao redor) e não germinados (ausência do micélio) cultivados em meio AA (ágar-água).

Fonte: Autor, 2018.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) utilizando 8 tratamentos (6 óleos essenciais, 1 testemunha somente água e 1 testemunha fungicida fluazinam 1%) com 4 repetições. Cada parcela experimental foi constituída por uma placa de Petri com 6 escleródios. Os dados foram submetidos ao Teste G-rho de Harrington e Fleming (1982) para comparação dos tratamentos com a testemunha e à análise de sobrevivência por meio do cálculo das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier utilizando a função survfit do pacote survival do software estatístico R.

3.5 TESTE DE TRIFENIL CLORETO DE TETRAZÓLIO (TCT)

O teste de Trifenil Cloreto de Tetrazólio (TCT) foi realizado em paralelo com o teste de germinação, afim de avaliar a viabilidade dos escleródios dos tratamentos. Para tanto, escleródios não germinados de cada tratamento (item 3.4) foram imersos em dois mL de solução de TCT 0,5% (pH 6,3 a 6,5) em vidros âmbar por 24 horas a 30°C (MARTINS et al., 2003).

Após o período de 24 horas, os escleródios foram lavados em água destilada, secos em papel-toalha e cortados ao meio para visualização da coloração. A avaliação foi realizada em

todos os escleródios de cada tratamento, verificando a mudança de coloração interna. Sendo que a coloração interna avermelhada, indica que há respiração dos tecidos, ou seja, os escleródios apresentam-se viáveis. Já quando a coloração interna for amarelada indica a ausência de respiração dos tecidos, conseqüentemente não há reação das enzimas e não ocorre a coloração dos tecidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Sclerotinia sclerotiorum*

Observa-se na Figura 4 a área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) e a porcentagem de inibição do crescimento micelial nos diferentes tratamentos testados.

Em relação aos valores do óleo essencial de capim-limão nas dosagens de 500 e 1000 ppm observou-se uma inibição de 100% do crescimento micelial, enquanto na dosagem de 250 ppm ocorreu uma redução de 48% da AACCM, quando comparado a testemunha (Figura 4B).

Semelhante ao óleo essencial de capim-limão, o óleo de cravo inibiu 100% o crescimento fúngico a partir da dose de 500 ppm (Figura 4C e Figura 6B), e em 250 ppm a redução foi de 45% da AACCM.

Através do uso do óleo essencial de Eucalipto, pode-se observar inibição total do crescimento micelial nas dosagens de 500 e 1000 ppm, além da redução de 44% na área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) para a dosagem de 250 ppm, quando comparado a testemunha (Figura 4 D).

A partir da obtenção dos resultados, não houve a necessidade de ser calculado o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) para esses tratamentos (cravo, capim limão e eucalipto), pois só houve crescimento na menor dose 250 ppm e para as doses de 500 e 1000 ppm houve inibição total do crescimento fúngico.

Para o óleo essencial de alecrim (Figura 6A) a AACCM nos tratamentos com as doses de 250 e 500 ppm, não diferiram estatisticamente (Figura 4A), ambas permaneceram acima de 80%, já o tratamento com 1000 ppm mostrou o melhor resultado para a inibição do crescimento do fungo, com AACCM em média de 50% em relação a testemunha. A partir disso, foi possível calcular o IVCM para as diferentes doses (Figura 5). Pode-se afirmar, que há uma diminuição na velocidade de crescimento micelial, com o aumento da dose do óleo essencial. O resultado obtido concorda com o trabalho realizado por Sousa et al. (2012), que constataram que o aumento da dose dos óleos essenciais, diminuem a IVCM levando até a inibição total do crescimento micelial dos fungos.

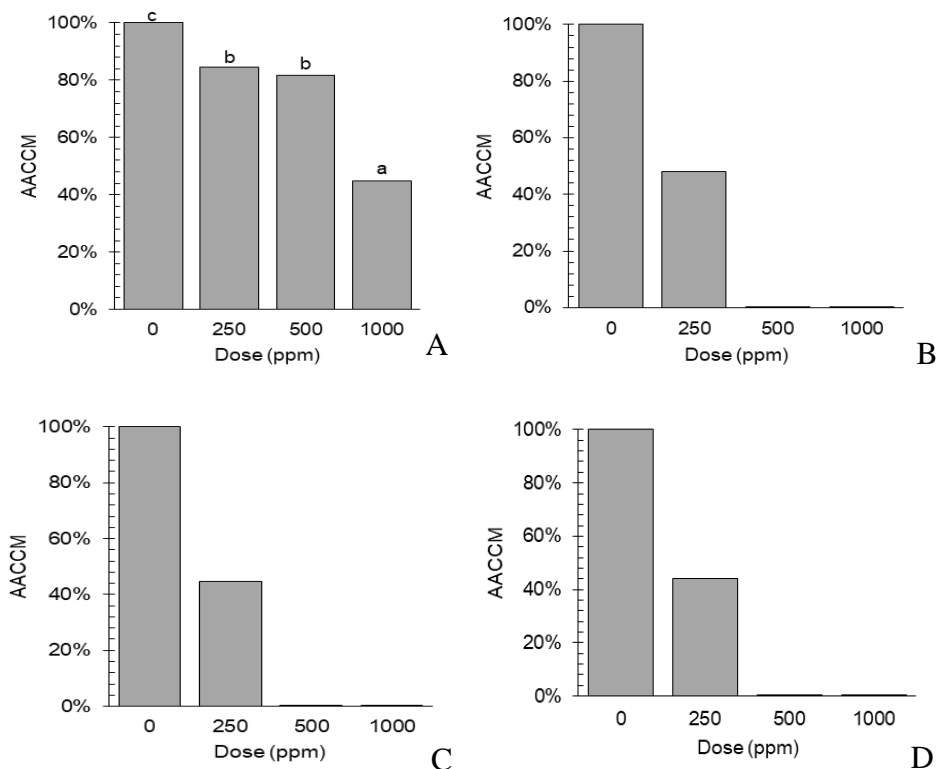


Figura 4: Área abaixo da curva de crescimento micelial (AACCM) (porcentagem%) de *Sclerotinia sclerotiorum* tratados com óleo essencial nas doses de 0, 250, 500 e 1000 ppm de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). (A), capim-Limão (*Cymbopogon citratus*) (B), cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) (C), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) (D).

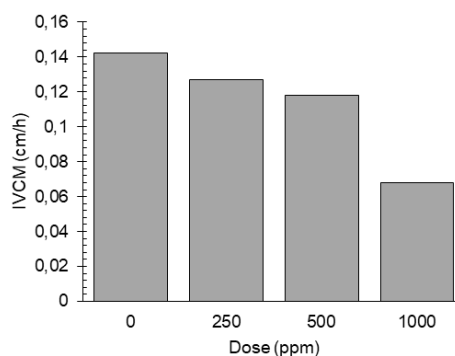


Figura 5: Índice de velocidade crescimento micelial (IVCM) (cm/h) de *Sclerotinia sclerotiorum* tratados com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) nas doses de 0, 250, 500 e 1000 ppm.

Com os resultados encontrados neste trabalho, fica evidente a atividade antifúngica dos óleos essenciais, pois, o estudo realizado para apresentar a “Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC 80%)” dos óleos essenciais realizado por Ksouri et al. (2017), apontaram que a atividade antifúngica do óleo essencial de alecrim apresentou um

MIC de 80% variando de 23,99 a 31,08 mg/L, ou seja, essa concentração foi a mínima encontrada para que haja inibição do fungo.

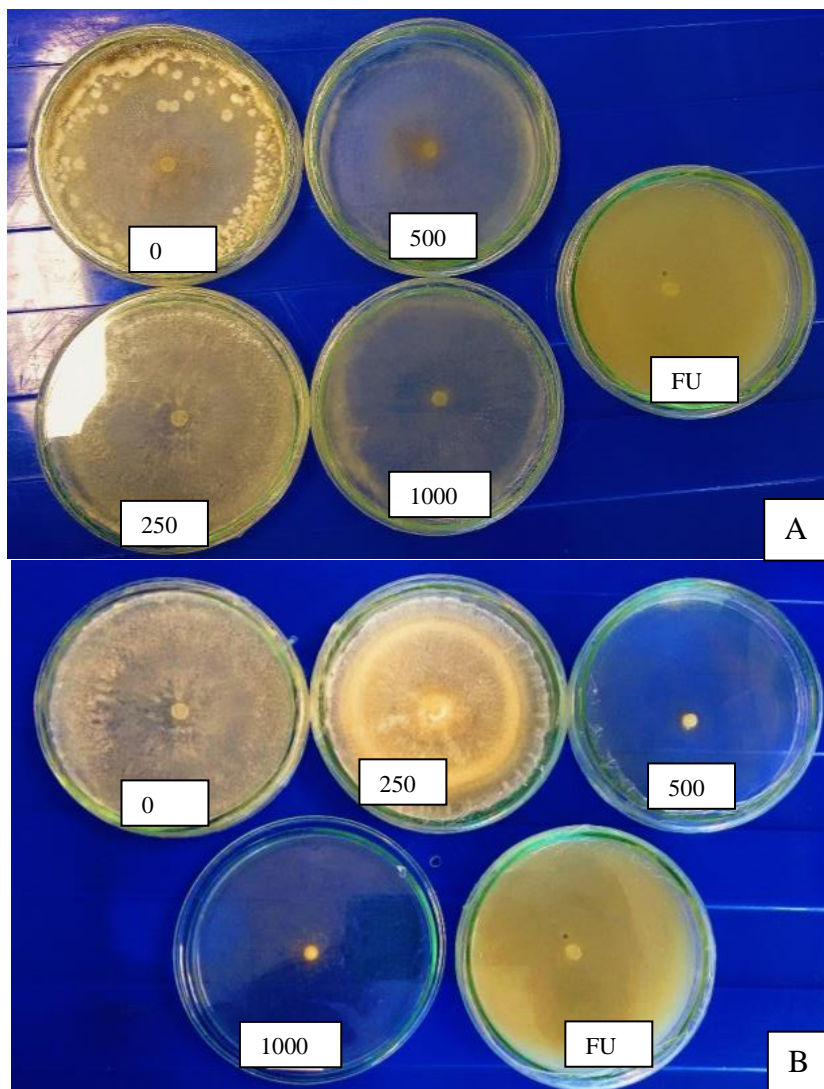


Figura 6: Crescimento micelial do Fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, tratados com óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) “A” e cravo da índia (*Syzygium aromaticum*) “B”, nas dosagens de 0, 250, 500 e 1000 ppm, além da testemunha tratada com Fungicida Fluazinam.

Fonte: Autor, 2018.

Ramos et al. (2016), constataram o efeito inibitório de diferentes concentrações de óleos essenciais e vegetais sobre *C. gloesporioides*, sendo avaliado a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). Relataram que o óleo essencial de capim-limão tem uma alta fungitoxicidade, tendo uma CIM de 3,2% e uma CFM de 6,25%, o óleo essencial de cravo, teve uma CIM maior, sendo de 6,25% e CFM com a mesma porcentagem. Os autores avaliaram ainda o óleo de eucalipto que apresentou uma CIM e

CFM de 1,7% e 3,2%, respectivamente. O que corrobora para os resultados encontrados nesse trabalho com o uso dos óleos essenciais como controle de fungos patogênicos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pierre (2009), onde foi verificado que as sementes de café tratadas com óleo essencial do cravo-da-índia nas dosagens de 0,25%, 0,50%, 0,75% e 100%, foram eficientes no controle de *C. gloeosporioides* associados às sementes, pois não houve crescimento micelial.

A partir dos resultados encontrados nesse trabalho comparado aos resultados obtidos por outros autores, é provado o potencial dos óleos essenciais de capim-limão, cravo e eucalipto como efeito fungicida, pelo fato desses óleos apresentarem em sua composição citral, eugenol e citronelal, que são substâncias que apresentam potencial antimicrobiano. O óleo essencial de alecrim também demonstrou potencial fungistático, uma vez que o mesmo mostrou-se eficaz na redução do IVCm do fungo *S. sclerotiorum*. A partir disso, estudos *in vivo* para verificar sua eficiência são necessários, principalmente em relação ao contato dos óleos essenciais com as plantas verificando se há ou não problemas com fitotoxidez.

4.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO DE ESCLERÓDIOS

Em relação aos dados da inibição da germinação dos escleródios os valores obtidos revelaram-se significativos, tanto os tratamentos em relação à testemunha como os tratamentos com o fungicida (Tabela 1).

Tabela 1: P-valor dos tratamentos em relação a testemunha e ao fungicida fluazinam (Cygnus®), obtidos através do teste de G-rho de Harrington e Fleming.

Tratamentos	p-valor	
	Testemunha	Fluazinam
Alecrim	<0,001	<0,001
Capim-Limão	<0,001	<0,001
Cravo	<0,001	<0,001
Eucalipto	<0,001	<0,001
Hortelã	<0,001	0,003
Gengibre	<0,001	<0,001

Com relação à Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a germinação dos escleródios (Figura 7). Os resultados da germinação dos escleródios tratados com os óleos essenciais na dose de 5000 ppm e com fungicida a 1%, pode-se observar no tratamento 0 ppm

(testemunha), que os escleródios iniciaram a germinação a partir do 5º dia após a instalação do experimento e a partir do 10º dia todos os escleródios do tratamento já estavam germinados.

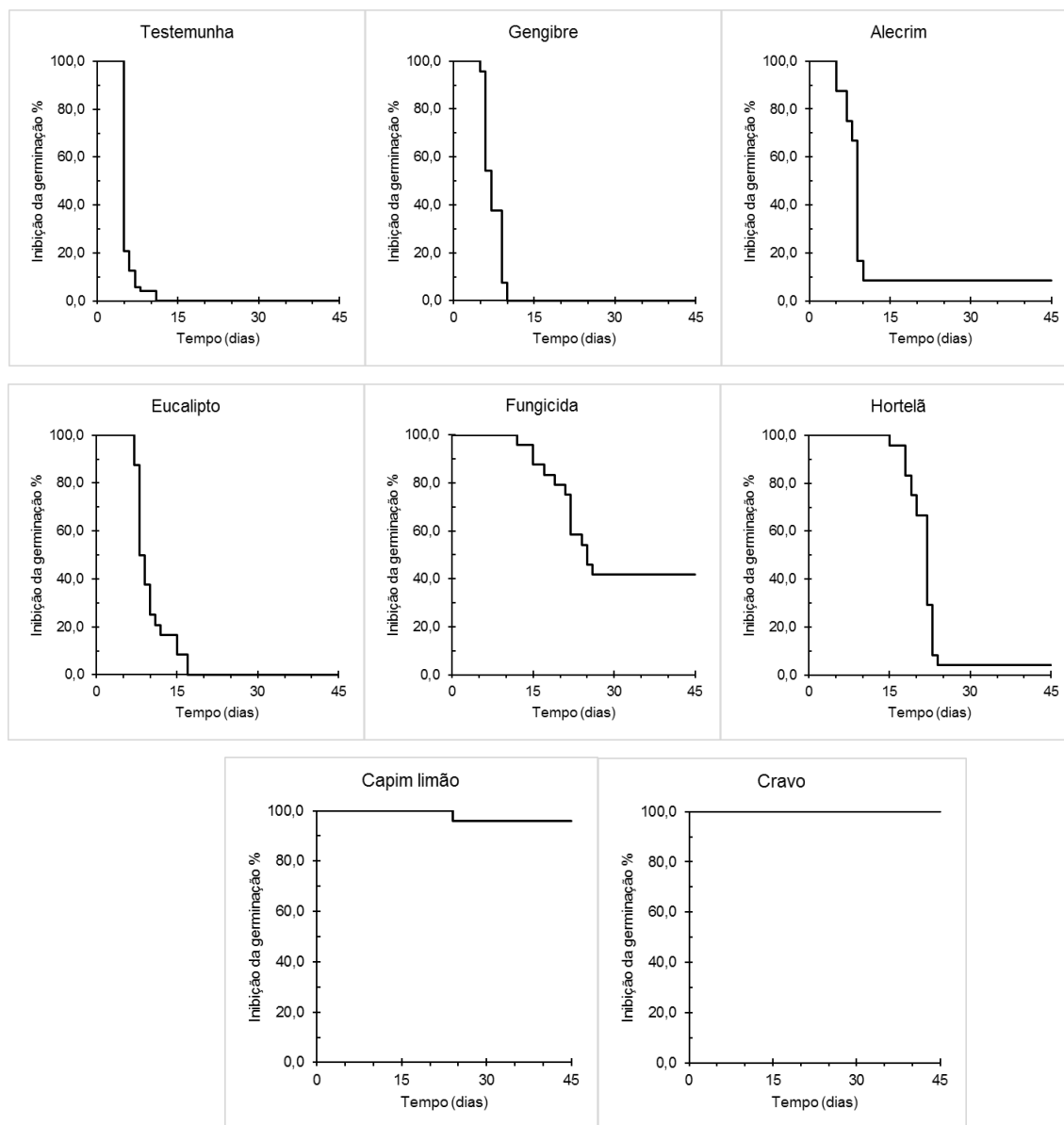


Figura 7: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier para a porcentagem de inibição da germinação de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* tratados com óleos essenciais de *R. officinalis*, *C. citratus*, *S. aromaticum*, *E. citriodora*, *M. arvensis* e *Z. officinallis* dose 5000 ppm, fungicida fluazinam (Cygnus®) e testemunha.

O tratamento com óleo essencial de gengibre, mostrou resultados semelhantes à testemunha, apresentando no 10º dia todos os escleródios germinados. Os óleos essenciais de alecrim e eucalipto inibiram a germinação até o 5º e 7º dia, respectivamente. O tratamento

com o fungicida (testemunha positiva) inibiu a germinação até 12º dia e a partir desse período permaneceu inibindo em 50% dos escleródios.

Já em relação ao tratamento com óleo essencial de hortelã inibiu até o 15º dia a germinação. O óleo essencial de capim-limão inibiu até o 24º dia e a partir deste período permaneceu com potencial de inibição de germinação em 94%. Já o óleo essencial de cravo inibiu 100% da germinação dos escleródios até o 45º dia.

Para a avaliação da viabilidade dos escleródios, foi realizado o teste de Tetrazólio, através da retirada dos escleródios não germinados dos tratamentos, no 45º dia. (Figura 8 e Tabela 2).

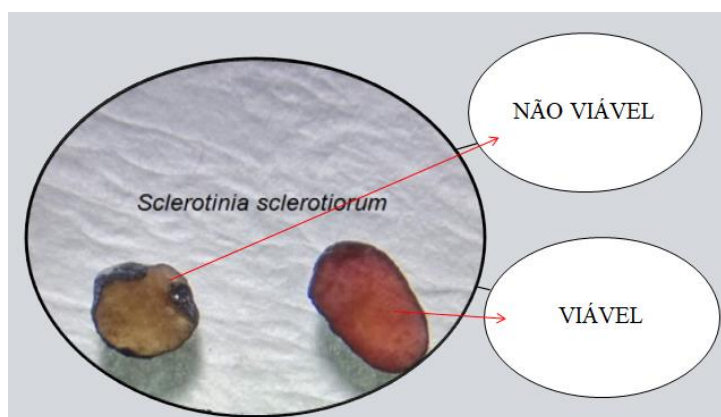


Figura 8: Observação da viabilidade de escleródios após teste TCT.

Fonte: Autor, 2018

Tabela 2: Viabilidade de escleródios do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* pelo teste Tetrazólio (%) sob tratamento com óleos essenciais de *C. citratus* e *S. aromaticum*, fungicida fluazinam a 1% e testemunha.

Teste TCT		
Tratamentos	Viáveis %	Inviáveis %
Testemunha	100%	0%
0 ppm		
Fungicida	100%	0%
fluazinam		
Cravo da Índia	0%	100%
5000ppm		
Capim limão	50%	50%
5000ppm		

A ausência de coloração no teste de TCT confirma a inativação dos escleródios tratados com os óleos. A falta de coloração vermelha dos escleródios indica que houve desnaturação protéica e inibição da atividade de desidrogenases. A partir do teste de

viabilidade para os escleródios não germinados e tratados com os óleos essenciais de capim-limão e cravo, obteve-se 50 e 0% de viabilidade, respectivamente. Já os escleródios tratados com o fungicida fluazinam tiveram 100% de viabilidade.

A inibição da germinação e inativação dos escleródios, através da aplicação de óleos essenciais, está relacionado ao potencial dos produtos majoritários dos óleos. O eugenol é a principal substância presente no óleo essencial de cravo e possui propriedades antifúngicas e hidrofóbicas, ou seja, ao ser adicionado em água não se mistura, assim o eugenol se adere a parede do escleródio que irá absorvê-lo, desta forma ocorre diversas alterações morfológicas, como a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares (VENTUROSOSO et al., 2011; COSTA et al., 2011).

A partir do resultado exposto das espécies *C. citratus* e *S. aromaticum* em apresentarem compostos antifúngicos e antimicrobianos, resultados obtidos neste trabalho corroboram com resultados de Guimarães et al. (2011), que constataram que o tratamento com capim-limão e citral, apresentam inibição ao desenvolvimento dos fungos *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Bipolaris* sp. e *Alternaria* sp.. Conforme os resultados encontrados pelos autores, houve um comportamento linear sobre a inibição do crescimento micelial nas diferentes concentrações de óleo essencial e citral.

Já em relação uso do óleo essencial de cravo da índia, onde foi encontrado 100% da inibição da germinação dos escleródios e após o teste de TCT que mostraram 100% dos escleródios inviáveis, colabora com trabalho realizado por Santos et al. (2007), em que foram observadas a inibição total do crescimento micelial de *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium* sp. quando tratados com a concentração de 500 ppm de óleo essencial. Costa et al. (2011), evidenciaram mudanças morfológicas no micélio fúngico de *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. solani*, quando tratados com concentração de 0,15% de óleo essencial do cravo da índia.

Brito e Nascimento (2015), avaliaram a atividade fungitóxica de diferentes extratos vegetais, no controle *in vitro* de *Curvularia eragrostidis*. Os extratos de nim e gengibre foram testados nas concentrações de 5, 15, 25, 35, e 45%. No estudo foi avaliado a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC). Dentre os extratos vegetais utilizados, o gengibre destacou-se a partir da menor concentração testada (5%), com PIC de 68,63%.

Já no estudo realizado por Itako et al. (2009), foi verificado que o extrato bruto aquoso de alecrim apontou significativos efeitos na inibição do crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos de *Cladosporium fulvum*, sendo que foram testadas concentrações de 20% e 40%, onde reduziu 85,72% e 93,49% a esporulação, respectivamente.

O trabalho realizado por Brum et al. (2014), avaliou a atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais em diferentes patógenos. O que comprova a atividade antifúngica do óleo essencial de capim-limão que mostrou-se mais eficiente na inibição do desenvolvimento do fitopatógeno *P. grisea*. O fungo apresentou crescimento apenas nas concentrações $0 \mu\text{L.mL}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo essencial, com crescimento de 41,9% menor que a testemunha. O estudo avaliou ainda o crescimento micelial do fungo *S. rolfsii*, onde na concentração $0,50 \mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo essencial de hortelã-pimenta, o patógeno apresentou desenvolvimento paralisado. Quando o patógeno foi exposto ao óleo essencial de capim-limão, não houve crescimento micelial em nenhuma das concentrações testadas.

Quanto ao uso do óleo essencial de eucalipto é comprovado sua atividade antifúngica por Castro e Lima (2010), que avaliaram as cepas de *Candida* sp., as quais foram utilizadas no estudo e mostraram-se sensíveis ao óleo essencial de *E. globulus* L., onde a CIM foi de $312,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, causando inibição de crescimento sobre 76,2% das cepas utilizadas no ensaio. Resultados promissores foram encontrados por Celoto et al. (2008), que avaliaram a percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e a percentagem de inibição de esporos (PIG) do fungo *C. gloeosporioides*. Como resultados, encontraram que o extrato aquoso de eucalipto teve um PIC maior que 50% e PIG de 97%.

Diante dos resultados encontrados verificou-se a capacidade dos óleos essenciais no controle de fungos, visto que em outros trabalhos obtiveram resultados com óleo essenciais no controle de alguns patógenos. As características e substâncias que os compõem, como citral e eugenol presentes nos óleos essenciais de capim-limão e cravo (GRANDI, 2014), são substâncias que podem se aderir nas estruturas dos patógenos e causarem diferentes alterações morfológicas, levando a inviabilidade dos mesmos, como foi observado no experimento com os escleródios. Assim é necessário realizar mais estudos para analisar a aplicação desses produtos no campo, conhecer as propriedades dos óleos essenciais e seu comportamento no solo.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de capim-limão, cravo da índia e eucalipto mostraram resultados promissores na inibição do crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*.

Para a germinação dos escleródios, os óleos essenciais de cravo da índia, capim-limão e hortelã apresentaram os melhores resultados, inibindo a germinação até o 45°, 24° e 15° dias, respectivamente.

O teste de TCT mostrou que houve a inviabilidade de 50% e 100% dos escleródios tratados com capim-limão e cravo da índia, respectivamente, mostrando assim o potencial do uso desses óleos como fungicidas.

Contudo, sabendo-se do efeito inibitório no crescimento micelial e na germinação dos escleródios, com a utilização de diferentes óleos essenciais, há a necessidade de verificar as características desses produtos em condições de campo, pois os fatores ambientais podem interferir de alguma forma nos resultados, sabendo que o solo apresenta propriedades químicas que pode interferir no efeito do óleo essencial, além da radiação solar e umidade relativa do ar, uma vez que os óleos essenciais possuem propriedades voláteis e necessidade de cuidados na aplicação, podendo assim investir na tecnologia de aplicação desses produtos no campo.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, W. P.; VIEIRA, G. H. C.. Efeito dos óleos essenciais sobre a antracnose in vitro e em frutos de mamoeiro. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 18, n. 1, p.367-372, fev. 2016.
- AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2005. 635p.
- AMORIM, L. et al. **Manual de Fitopatologia**. 5. ed. Ouro Fino - Mg: Agronômica Ceres, 2016. 810 p.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704p.
- BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesq. Agropec. Trop**, Goiânia, v. 4, n. 43, p.436-440, dez. 2013.
- BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plants of hostes *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n.1, pg. 93 – 108. 1994.
- BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal Of Medicine**, Blida, v. 1, n. 9, p.1-10, set. 2014.
- BRITO, N. M.; NASCIMENTO, L.C. Potencial fungitóxico de extratos vegetais sobre *Curvularia eragrostidis* (P. Henn.) Meyer in vitro. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v. 17, n. 2, p.230-238, 2015.
- BRUM, R. B. C. S. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre fungos fitopatogênicos. **Magistra**, Santa Cruz do Sul, v. 26, n. 3, p.361-371, set. 2014.
- CASTRO R.D.; LIMA E.O. Antifungal activity of the essential oils from *Eucalyptus globulus* L. on *Candida* spp. **Rev Odontol UNESP**. v. 39 n. 3 p. 179-184. 2010.
- CELOTO, M. I. B. et al. Atividade antifúngica de extratos de plantas a *Colletotrichum gloeosporioides* g. **Acta Sci. Agron.**, Maringá-pr, v. 30, n. 1, p.1-5, nov. 2008.
- CHIAMAHA, O.M.R. et al. Characterization and *in vitro* antifungal potential of *Rosmarinus officinalis* and *Eucalyptus globulus* essential oils on phytopathogen *Colletotrichum* sp. **World Journal of Microbiology**, v. 3, n.1, p-37-42, 2016.
- COSTA, A.R.T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.2, p.240-245, 2011.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, Laurence V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York:Ed. J. Wiley, 1990.

DABAGUE, I.C.M et al. Essential oil yield and composition of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) rhizomes after different drying periods. **Rev. bras. plantas med.** 2011, vol.13, n.1, pp.79-84. ISSN 1516-0572

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **ISSN 2176-2864**: Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2016/17: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa, 2017. 6 p.

FONSECA, M.C.M. et al. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Rev. Bras. Plantas Med.**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.45-50, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Medicinais**: Mineiras, Nativas e Cultivadas. Belo Horizonte: Adequatio Estúdio, 2014. 1204 p.

GUIMARÃES, L.G.L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p.464-472, jun. 2011.

HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., CHATHA, S. A. S., JABBAR, A., MAHBOOB, S. & NIGAM, P. S. 2010. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant, and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41(4): 1070-1078.

ITAKO, A.T. et al. *Cymbopogon citratus* essential oil bioactivity and the induction of enzymes related to the pathogenesis of *Alternaria solani* on tomato plants. **Idesia** (Arica. Impresa), v. 31, p. 11-17, 2013.

ITAKO, A.T. et al. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, p.75-83, 2009.

KSOURI, S. et al. Atividade antifúngica do extrato de óleos essenciais de *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. e *Thymus ciliatus* Desf. contra *Candida albicans* isoladas de mastite clínica bovina. **Science Direct**, Algeria, v. 27, n. 2, p.245-249, jun. 2017.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663p.

LORENZETTI, E. R. et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morangueiro. **Rev. Bras. Pl. Med**, Botucatu, v. 1, n. 13, p.619-627, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas** . Nova Adessa, SP: Instituto Plantarum, 2ª Ed, p. 540, 2008.

MARTINS, M.V.V. et al. Erradicação de escleródios de *Sclerotium rolfsii* em substratos tratados em coletores solares, em Campos dos Goytacazes-RJ. **Rev. Bras. Frutic**, Jaboticabal, v. 25, n. 3, p.421-424, 2003.

MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; GODOY, C.V.; Utiamada, C.M. Ensaio cooperativos

de controle biológico de mofo-branco na cultura da soja: safras 2012 a 2015. 100 p Londrina: Embrapa Soja. 2016.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: Imprensa Universitária, 2001. 368 p.

MUELLER, D. S., DORRANCE, A. E., DERKSEN, R. C., OZKAN, E., KURLE, J. E., GRAU, C. R., GASKA, J. M., HARTMAN, G. L., BRADLEY, C. A., and PEDERSEN, W. L. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of Sclerotinia stem rot on soybean. **Plant Dis.**86:26-31. 2002.

PIERRE, R. O. **Óleo essencial e extrato de cravo-da-índia no controle de *colletotrichum gloeosporioides*, agente da mancha manteigosa, em sementes e mudas de café**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fitopatologia, Ufla, Lavras-MG, 2009.

SCAVRONI, J., BOARO, C. S. F., MARQUES, M. O. M., & FERREIRA, L. C. . Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L.(Lamiaceae) grown with biosolid. **Brazilian Journal of Plant Physiology**,v.17, n.4, p: 345-352. 2005

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: Fealq, 2005.p. 125-138.

SANTOS, L. G. M. dos et al. Avaliação do potencial fungitóxico do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) MERR & PERRY (CRAVO-DA-ÍNDIA). **Tecnológica**, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p.11-14, dez. 2007.

SILVA, I. et al. **Noções Sobre o Organismo Humano e Utilização de Plantas Medicinais**. 4. ed. Cascavel: Assoeste, 1995. 203 p.

SOUSA, R.M.S; SERRA, I.M.R.S; MELO, T.A. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.1, p.42-47, 2012.

SUMIDA, C. H. et al. 90 Summa Phytopathol., Botucatu, v. 40, n. 1, p. 90-91, 2014Inibição micelial in vitro de *Sclerotinia sclerotiorum* por fungicidas. **Summa Phytopathology**, Botucatu, v. 40, n. 1, p.90-91, fev. 2015.

PIATTI, A.; SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H. Efeito in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* sobre o crescimento e desenvolvimento de *Penicillium* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.1033-1040, 29 ago. 2011. Universidade Estadual de Londrina.

PINTO, D. A. et al. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v. 1, n. 16, p.54-61, jun. 2014.

RAMOS, K. et al. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 18, n. 2, p.605-612, ago. 2016.

TALAMINI, V.; STADNIK M.J. **Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas**. CCA/UFSC, p.45-62. 2004.

VENTUROSO, L.R.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Antifungal activity of plant extracts on the development of plant pathogens. **Summa Phytopathologica**, v.37, n.1, p.18-23, 2011.

VIEIRA, R.F., PAULA JÚNIOR, T.J. de, PERES, A.P. & MACHADO, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira** 26:770-773. 2001.

WATANABE C.H.; NOSSE T.M.; GARCIA C.A.; PINHEIRO; P. N.. Extração do óleo essencial de menta (*Mentha arvensis* L.) por destilação por arraste a vapor e extração com etanol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v.4 p.76-86. 2006.

ZANCAN, W. L. A. **Sensibilidade a fungicidas e efeito de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijoeiro**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011. Cap. 1.